

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. P. Klein

**DIE IMMUNOLOGISCHE ROLLE DER
ZENTRALEN LYMPHE BEI DER INFEKTABWEHR
GEGEN FAKULTATIV INTRAZELLULÄRE BAKTERIEN**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
den Medizinischen Fachbereichen
vorgelegt von

Leopold Weber
aus Gustavsburg

Mainz 1975

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. P. Klein

**DIE IMMUNOLOGISCHE ROLLE DER
ZENTRALEN LYPHE BEI DER INFEKTABWEHR
GEGEN FAKULTATIV INTRAZELLULÄRE BAKTERIEN**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
den Medizinischen Fachbereichen
vorgelegt von

Leopold Weber
aus Gustavsburg

Mainz 1975



Fachbereichsdekan: Professor Dr. P. Klein

Referent: Professor Dr. H. Hahn

Korreferent: Professor Dr. M. Loos

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
A) <u>Einleitung</u>	1
1. Aufgabe und Aufbau des Immunsystems	1
2. Die Rolle des Immunsystems bei der Abwehr bakterieller Infektionen	3
3. Zelluläre antibakterielle Immunität	5
4. Die immunologische Rolle der Ductus-thoracicus-Lymphozyten	8
5. Ziel der eigenen Untersuchungen	8
B) <u>Materialien und Methoden</u>	10
C) <u>Ergebnisse</u>	20
I. Erarbeitung des Versuchsmodells	20
1. Messung des Verlaufs einer experimentellen Listeriose	20
2. Testung des Immunstatus mit Hilfe der allergischen Reaktion vom verzögerten Typ	22
3. Übertragung von Anti-Listerien-Immunität durch Milzzellen aus Spendern mit einer sechs Tage alten Listerieninfektion	24
II. Untersuchung mit der Lymphe aus Listeria-immunen Mäusen	26
1. Zelluläre Zusammensetzung	26
2. Die biologische Aktivität von Ductus-thoracicus-Lymphozyten aus Listeria-immunen Mäusen	26
3. Nachweis von MIF-artiger Aktivität in der zentralen Lymphe Listeria-immuner Mäuse	30
D) <u>Diskussion</u>	32
E) <u>Zusammenfassung</u>	36
F) <u>Literaturverzeichnis</u>	37



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554413_0121

DIE IMMUNOLOGISCHE ROLLE DER ZENTRALEN LYMPHE BEI DER INFEKTABWEHR GEGEN FAKULTATIV INTRAZELLULÄRE BAKTERIEN

A) Einleitung

1. Aufgabe und Aufbau des Immunsystems

Aufgabe der körpereigenen Abwehr ist die Wahrung der stofflichen Individualität des Organismus. Es müssen eingedrungene Fremdstoffe inaktiviert oder vernichtet werden. Für diese Aufgabe stehen unspezifische und spezifische Faktoren zur Verfügung. Die Produktion unspezifischer Abwehrfaktoren ist nicht von einem vorhergehenden Kontakt mit dem Fremdstoff abhängig. Spezifisch sind diejenigen Produkte, die erst nach Kontakt mit den Fremdstoffen entstehen. Der Anteil des Abwehrsystems, der für die Produktion der spezifischen Faktoren verantwortlich ist, heißt Immunsystem. Substanzen, die die Bildung von Immun-Produkten induzieren, heißen Antigene. Kontakt des Immunsystems mit Antigenen führt demnach zur Bildung von Immun-Produkten. Dieser Vorgang wird als Sensibilisierung bezeichnet. Unspezifische und spezifische Abwehrfaktoren liegen sowohl in humoraler als auch in zellulärer Form vor (s. Tab. 1).

Tab. 1: Spezifische und unspezifische Abwehrfaktoren

	Humoral	Zellulär
Unspezifisch	Komplement, Kininsystem, Properdinsystem, Interferon, Endogenes Pyrogen	polymorphkernige Granulozyten, mononukleäre Phagozyten, Mastzelle
Spezifisch	Antikörper IgG, IgA, IgM IgE, IgD;	spezifisch reagible T-Lymphozyten O-Zellen

Die in Tab. 1 aufgeführten Faktoren kommen nicht isoliert zum Einsatz; vielmehr treten sie miteinander in Wechselbeziehung, um den erforderlichen Schutz gewährleisten zu können. Hierbei hat sich als Prinzip ergeben, daß die Immunreaktion (d. h. die Reaktion zwischen spezifischen Immun-Produkt und Antigen) eine Auslöser-Funktion erfüllt. Unspezifische Faktoren werden durch die Immunreaktion aktiviert und wirken im Sinne von Amplifikatoren, die die eigentliche Abwehrleistung erbringen (12).

Die Unterteilung der spezifischen Immun-Produkte in humorale Antikörper und spezifisch reagible Lymphozyten (Tab.1) spiegelt sowohl eine funktionelle als auch eine phylogenetische Zweiteilung wieder: Die Bildung der humoralen Antikörper, antigenspezifischer Proteine, erfolgt durch B-Lymphozyten, die dem Knochenmark entstammen. Unter dem Einfluß des sogenannten Bursaäquivalents¹⁾ erwerben sie die Immunkompetenz, d. h. die Fähigkeit Antigen zu erkennen (9). Geraten immunkompetente B-Lymphozyten unter Antigeneinfluß, so profilieren sie und differenzieren sich zu antikörperbildenden Plasmazellen²⁾.

Die zellulären Immun-Produkte (spezifisch reagible Lymphozyten) reagieren als Ganzes mit Antigen. Auf der Membran dieser Lymphozyten befinden sich Antigen-erkennende Rezeptoren, die nicht in die Zirkulation abgegeben werden. Die Vorläufer der spezifisch reagiblen Lymphozyten werden zwar auch im Knochenmark gebildet, ihre Reifung erfolgt jedoch unter dem Einfluß des Thymus (27). Man bezeichnet sie deshalb als T-Lymphozyten. T-Lymphozyten erfüllen zwei Aufgaben: einmal sind sie für die

1) Die Bursa Fabricii ist ein Anhangsorgan am Ende des Gastrointestinaltraktes bei Vögeln. Das funktionelle Äquivalent der Bursa beim Säuger konnte von der Lokalisation her noch nicht festgelegt werden. Magen-Darm-Trakt sowie Knochenmark sind als Bursa-Äquivalent in der Diskussion.

2) Da einige Autoren heute das Bursaäquivalent beim Säuger im Knochenmark = bone marrow sehen, wird B auch als von bone marrow abgeleitet betrachtet.

Auflösung von zellulären Immunreaktionen verantwortlich. Zum anderen leisten sie eine Helferfunktion bei der Differenzierung von B-Lymphozyten zur antikörperbildenden Plasmazelle, wenn die Antigenstimulierung der B-Zelle durch thymusabhängige Antigene erfolgt (5). So sind neonatal thymektomierte oder thymuslos geborene Mäuse nur noch in beschränktem Ausmaß zu T-Zell-abhängigen Immunleistungen befähigt (8, 25, 29, 32).

Trotz der tiefgreifenden funktionellen Unterschiede zwischen B- und T-Zellen ist es nicht möglich, beide Zelltypen lichtmikroskopisch zu unterscheiden. Die T-Lymphozyten tragen aber ein spezifisches Antigen (theta-Antigen) auf ihrer Oberfläche, so daß sie durch Zugabe von anti-theta-Serum und Komplement aus einer Mischpopulation aus B- und T-Zellen entfernt werden können (15, 28). Das theta-Antigen dient heute als hauptsächliches Merkmal für die Unterscheidung von B- und T-Zellen.

2. Die Rolle des Immunsystems bei der Abwehr bakterieller Infektionen

Gegen Ende des neunzehnten Jahrhunderts hatten sich zwei Lehrmeinungen über den Mechanismus der antibakteriellen Abwehr gebildet. Beeinflußt durch die Untersuchungen v. Behrings und Kitasatos über die Bildung und Wirkungsweise von Diphtherie-Antitoxin, neigt die Mehrzahl der Immunitätsforscher dazu, in den spezifischen Antikörpern das alleinige Abwehrinstrument zu sehen. Demgegenüber verfocht Elias Metchnikoff (24) eine zelluläre Theorie der Infektabwehr. Nach dieser sind in ihrer Kompetenz breit angelegte Freßzellen (Makrophagen) in der Zirkulation und im Gewebe für die Abtötung der Bakterien verantwortlich. Der Unterschied in den Lehrmeinungen blieb bestehen, bis im Jahre 1903 Wright und Douglas (40) zeigen konnten, daß sowohl die humoral-spezifischen als auch die zellulär-unspezifischen Faktoren an der Abwehr-

leistung beteiligt sind: Diese Autoren konnten zeigen, daß die Phagozytose von Pneumokokken durch Leukozyten dann drastisch gesteigert ist, wenn die Bakterien mit antikörperhaltigem Serum vorinkubiert werden. Mit diesem Versuch war das klassische Konzept der humoral-spezifisch induzierten Infektabwehr umrissen. Humorale Antikörper opsonisieren Bakterien und bereiten sie damit für die unspezifische Phagozytose vor. Dieses Konzept hat aber nur für die Abwehr der Erreger von eitrigen Entzündungen (insbesondere von Kokken) uneingeschränkte Gültigkeit.

Indessen blieb die Frage nach den Grundlagen der Immunität gegen bakterielle Infektionen ungeklärt, bei denen humorale Antikörper keine entscheidende protektive Rolle spielen. Die Erreger dieser Infektionen werden in der Gruppe der fakultativ-intrazellulären Bakterien zusammen gefaßt. Hierunter fallen Mykobakterien, Brucellen, Listerien u. a. Sie haben die Fähigkeit der intrazellulären Persistenz, d. h. sie werden nach der Phagozytose von den Phagozyten nicht abgetötet, sondern leben in einem labilen Gleichgewicht mit der Wirtszelle. Klinisch handelt es sich bei Infektionen mit diesen Erregern um protrahiert verlaufende Krankheitsbilder. Pathologisch-anatomisch steht nicht der Eiter, sondern die Ausbildung von Granulomen aus mononukleären Zellelementen im Vordergrund. An immunologischen Parametern bildet sich regelmäßig eine verzögerte Allergie aus; d. h. nach Injektionen von bakteriellem Antigen in die Haut eines infizierten Individuums tritt nach 24 - 48 Stunden eine Entzündung auf, die sich nur streng antigen-spezifisch auslösen läßt. Antikörper können zwar auch in großer Menge gebildet werden, sie sind jedoch im Hinblick auf eine protektive Funktion wirkungslos, und die Bereitschaft zur allergischen Reaktion läßt sich nicht durch Antikörper übertragen. Diese Verhältnisse waren schon im Jahre 1918 von Zinsser (41) beschrieben worden, der sogar den Ausdruck Bakterienallergie für die allergische Reaktionsbereitschaft bei

Infektionen mit fakultativ-intrazellulären Keimen prägte. Aber erst 1945 gelang es M. W. Chase (4), Tuberkulinallergie mit Hilfe von Peritonealexsudatzellen (aber nicht durch Antikörper) aus immunisierten Spendermeerschweinchen auf normale Empfängertiere zu übertragen. Dieser Versuch bedeutet den Beginn der Zellular-Immunologie, der Lehre von den antigenspezifischen zellulären Produkten des Immunsystems.

Über die Natur der Allergie-übertragenden Zellen war damit noch nichts gesagt. Das entscheidende Experiment in dieser Richtung führten Coe, Feldman und Lee (6) im Jahre 1966 durch, als sie mit Zellen aus dem Ductus thoracicus von immunisierten Ratten Tuberkulinallergie auf normale Empfängertiere übertrugen. Damit war die Natur der die Allergie übertragenden Zellen geklärt.

Die genannten Arbeiten hatten die Aufklärung der Mechanismen der verzögerten Allergie zum Ziel. Ob und inwieweit letztere an der Abwehr der Infektionen, die zu ihrer Ausbildung führen, beteiligt ist, blieb vorläufig noch ungeklärt. Es ist das Verdienst von Mackaness, diese bei der Erforschung der verzögerten Allergie erarbeiteten Prinzipien auf die Abwehr von Infektionen mit fakultativ-intrazellulären Keimen übertragen zu haben (17).

3. Zelluläre antibakterielle Immunität

Am Modell der Listeriose der Maus konnte Mackaness zeigen, daß bei der Abwehr von intrazellulären bakteriellen Infektionen den spezifisch reagiblen Lymphozyten und den Makrophagen in gleicher Weise eine entscheidende Rolle zukommt (18). Im Verlauf einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* kommt es zunächst zu einem Anstieg der Bakterienzahl in Leber und Milz der infizierten Tiere. Am dritten Tag fallen die Bakterienzahlen ab, und es machen sich zu diesem Zeitpunkt auffällige Veränderungen in dem infizierten Organismus bemerkbar: es entstehen keimhaltige Granulome aus mononukleären Phagozyten und

Lymphozyten. Die in den Granulomen befindlichen Keime zeigen morphologische Veränderungen im Sinne einer Devitalisierung. Gleichzeitig tritt eine Allergie vom verzögerten Typ gegen *Listeria*-Antigen auf. In vitro zeigen Makrophagen aus infizierten Tieren eine im Vergleich zu normalen Kontrollen gesteigerte Abtötungsfähigkeit gegenüber fakultativ-intrazellulären Bakterien (19). Diese gesteigerte Bakterizidie ist aber nicht auf den infizierenden Keim (in diesem Falle *Listeria monocytogenes*) beschränkt, sondern sie erstreckt sich auf eine Vielzahl von serologisch nicht verwandten fakultativ-intrazellulären Bakterien (2).

In ihrer Gesamtheit ließen diese Einzelbeobachtungen den Schluß zu, daß die beschriebenen Veränderungen Ausdruck einer im Verlauf der Infektion erworbenen Immunität sind. Das Verständnis der zugrundeliegenden Vorgänge war aber dadurch erschwert, daß unspezifisch aktivierte Zellen die Keimabtötung bewerkstelligten, während sich auf der anderen Seite die Induktion der Immunität als streng Antigen-spezifisch erwies (20). Diese Verständnisschwierigkeit war bewältigt, als gezeigt werden konnte, daß der unspezifischen Makrophagenaktivierung eine zellulär-spezifische Immunreaktion vorausgeht. Hierbei erwies sich die passive Übertragung der anti-*Listeria*-Immunität als Schlüsselexperiment (18). Werden nämlich einer normalen Maus Milzzellen aus einem *Listeria*-immunen Spender übertragen, so manifestiert das Empfängertier bei einer anschließenden *Listeria*-Infektion eine Immunität ohne Latenzzeit. Voraussetzung ist, daß die übertragenen Zellen im Empfänger mit dem homologen Antigen in Berührung kommen. Das heißt die übertragene Immunität erfolgt Antigen-spezifisch. Einmal entstanden ist sie wiederum unspezifisch. Das Milzzellinokulum enthält demnach einen antigenspezifischen zellulären Faktor, der zunächst mit dem Antigen reagieren muß, damit die zur Bakterienabtötung führenden Veränderungen im Empfänger erreicht werden. Diese Veränderungen sind wie im aktiv immunisierten Tier

die Makrophagenaktivierung und die Granulombildung.

In weiterführenden Experimenten konnten unabhängig voneinander Lane und Unanue (15) und North (28) den Beweis erbringen, daß es sich bei diesen Lymphozyten um theta-positive T-Lymphozyten handelt. Mit diesen Versuchen war die Immunreaktion, die zur anti-Listeria-Immunität führt, eindeutig dem Bereich der Thymus-abhängigen zellulären Immunität zugeordnet.

Über den Mechanismus der Wechselwirkung zwischen Antigen-stimulierten spezifisch reagiblen T-Lymphozyten und Makrophagen ist damit nichts ausgesagt. Verschiedene Autoren (31) konnten zeigen, daß spezifisch reagible T-Lymphozyten unter Antigenstimulierung in vitro eine Reihe von biologisch aktiven Substanzen, sog. Lymphokine freisetzen. Lymphokine wirken in verschiedenartiger Weise auf Makrophagen in vitro ein: So behindert beispielsweise der migrationsinhibierende Faktor (MIF) ihre Wanderung, der makrophagenaktivierende Faktor (MAF) aktiviert und ein chemotaktischer Faktor, ausgetestet in der Boyden-Kammer, wirkt chemotaktisch auf Makrophagen ein. Es liegt daher nahe anzunehmen, daß Lymphokine auch in vivo als Mediatoren der Lymphozyten-Makrophagen-Interaktion eine Rolle spielen. Aus diesem Grunde ist auch versucht worden, von Lymphozyten herstammende Produkte mit Lymphokin-artiger Wirkung in vivo am sensibilisierten Ganztier nachzuweisen. Salvin et al. (37) konnten MIF-artige Aktivität in Meerschweinchen mit verzögerter Tuberkulin-allergie nachweisen; Hay et al. (13) fanden MIF-artige Aktivität in der efferenten Lymphe, die aus einem Axillarylphknoten eines Tuberkulin-positiven Schafes gewonnen wurde. Eine eindeutige Rolle solcher Faktoren bei der zellulären antibakteriellen Immunität ließ sich aber bisher noch nicht am in vivo-Modell beweisen.

4. Die immunologische Rolle der Ductus-thoracicus-Lymphozyten

Die Arbeiten von Gowans (11), Sprent (38, 39), Miller (26), sowie von Koster und McGregor (14, 22) haben entscheidende Fortschritte in unserer Kenntnis über die biologischen Eigenschaften von Lymphozyten erbracht. Bei diesen Studien erwies sich die Ductus-thoracicus-Drainage als entscheidende Hilfe. Mit dieser Technik konnten Untersuchungen über die Bildung und Migrationseigenschaften der Lymphozyten, ihre biologische Rolle und die zelluläre Zusammensetzung der zentralen Lymphe bei normalen und immunisierten Tieren durchgeführt werden. Vor allem aber wurde es möglich, mit reinen Lymphozytenpopulationen zu arbeiten. Dieser Vorteil ist nicht unerheblich, da bei Benutzung anderer Lymphozytenquellen (Lymphknoten, Milz, Peritonealexsudat) regelmäßig eine große Zahl nicht-lymphoider Zellen in der Suspension vorhanden ist. Diese Verunreinigungen fallen dann ins Gewicht, wenn die morphologisch oft nicht unterscheidbaren, jedoch funktionell verschiedenen, mononukleär-phagozytären Zellen oder deren Vorläufer ausgeschaltet werden sollten, beispielsweise bei Versuchen *in vitro* (21, 30).

5. Ziel der eigenen Untersuchungen

Bei den meisten *in vitro*- und *in vivo*-Studien (2, 10) werden Peritonealexsudate oder Milzzellsuspensionen als Lymphozytenquelle benutzt, da die Gewinnung von reinen Lymphozytenpopulationen aus dem Ductus thoracicus von Mäusen mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden ist. Diesem Umstand dürfte es zuzuschreiben sein, daß bisher noch keine Untersuchung in der Literatur aufgetaucht ist, die eine erfolgreiche Übertragung von zellulärer antibakterieller Immunität mit Ductus-thoracicus-Lymphozyten bakteriell immunisierter Mäuse beschreibt.

Die im Folgenden beschriebenen Experimente haben zum Ziel, die aufgezeigten Lücken in der Literatur zu schließen. Mit Hilfe der Ductus-Drainage der Maus wurde aus Listeria-immunen Spendern Lymphozyten gewonnen und im Übertragungsversuch auf ihre immunologische Aktivität geprüft. Die bei der Ductus-Drainage anfallende Lymphe wurde auf das Vorhandensein von Makrophagen-inhibierender Aktivität untersucht.

B) Materialien und Methoden

1. Materialien

- 1.1. Medien : Hanks' Minimal Essential Medium (MEM, Flow Laboratories) mit 5 % foetalem Kälberserum (FCS, Flow), 5 Einheiten Heparin pro ml (Thrombophob^R, Nordmark) und 100 Einheiten Penicillin-Streptomycin pro ml (Flow). Das Medium wurde mit sterilem, 3,5 %igem Natriumbikarbonat auf einen pH von 7,3 eingestellt und begast.
- 1.2. Nährböden : Tryptose-Soya-Agar, bzw. -Bouillon (Oxoid)
- 1.3. Bakterien : *Listeria monocytogenes*, Stamm EGD, Sertyp I, wurde durch ständige Mäusepassagen virulent gehalten. Die Mäuse wurden mit etwa 2×10^3 lebenden Listerien in 0,2 ml physiologischer Kochsalz-Lösung intravenös infiziert.
- 1.4. Tiere : Mäuse des Stammes CD-1 (Charles River Laboratories, Wilmington, Mass.), in eigener Zucht produziert. DTL-Spender hatten ein Gewicht von 25 - 30 g, alle anderen verwendeten Tiere wogen 18 - 22 g. Es wurden männliche und weibliche Tiere verwendet.
- 1.5. Geräte
- 1.5.1. Homogenisator nach Potter Elvehjem (Braun Melsungen, Homogenisator Potter S), 1500 Upm.

- 1.5.2. Homogenisatorgefäß mit Überlaufkammer aus Borsilikatglas, mit eingeschlif- fenen Glaskolben (Braun Melsungen).
- 1.5.3. Zylindrische Homogenisatorgefäße, Typ Potter Elvehjem, s 31, mit geraden Teflonpistillen, S 21 (TRI-R Instru- ments Inc.).
- 1.5.4. "Schnelltaster", System Kröplin (H.C. Kröplin GmbH, Schlüchtern).
- 1.6. Anästhetikum : Zur Herstellung von 100 ml wurden 2 g 2,2,2, Tribromäthanol (Merck) in 2 ml Amylalkohol gelöst und zu 98 ml physio- logischer Kochsalzlösung gegeben. Das Gemisch wurde anschließend 5 Minuten bei 60° C geschüttelt.
- 1.7. Operations- : 1 gebogene und 1 gerade anatomische
besteck Pinzette,
Wattestäbchen,
1 gerade, spitze Schere,
4 Retraktoren aus Stahldraht,
1 feinste Uhrmacherpinzette,
Michel-Klemmen,
1 mit Aluminiumfolie überzogene Styroporplatte als Unterlage,
mehrere ca. 30 cm lange Pferdehaare.
- 1.8. Operations- : Carl Zeiss Stereomikroskop IV
mikroskop
- 1.9. Katheter : Boak Cannula, Länge 28 cm spec.
No. 40/6, Portland Plastics Limited,
Hythe, Kent.

- 1.10. Gewebeklebstoff : Bucrylat^R (Ethicon, Hamburg-Norderstedt)
- 1.11. Vorrichtung zur : Dieses Spezialgerät wurde nach
Fixierung von Plänen von Dr. John Sprent in der
DTL-Spendern Werkstatt des Pharmakologischen
Institutes der Universität Mainz
gebaut.
- 1.12. Infusionssystem : Perfusionspumpen Typ 871102 mit
50 ml Glasspritzen System Luer-Lok
Braun, Melsungen.
- 1.13. Infusionslösung : Ringerlösung mit Zusatz von 5 %
Glukose.
- 1.14. MIF-Test : Plastik-Testplatten der Firma
Greiner, Kapillarröhrchen Länge
75 mm, ä Ø 1,3 - 1,4 mm,
Plastilin,
Okularmikrometer, Carl Zeiss Kpl
12,5

2. Methoden

2.1. Herstellung der Bakteriensuspension zur Infektion

Mäuse wurden mit etwa 2×10^3 lebenden Listerien intravenös infiziert. Drei Tage später wurde die Milz steril entnommen und in 9 ml physiologischer Kochsalzlösung homogenisiert. Geeignete Mengen (0,1, 0,05, 0,01 ml) des Homogenates wurden in Tryptose-Soya-Bouillon für 12 Stunden inkubiert und die erhaltene Bakteriensuspension mit physiologischer Kochsalzlösung nach Zählung in einer Petroff-Hauser-Kammer auf die gewünschte Keimzahl eingestellt. Gleichzeitig wurde zur Kontrolle 0,1 ml einer geeigneten Verdünnung auf Tryptose-Soya-Agar aufgebracht

und nach 24 Stunden die Zahl der gewachsenen Kolonien bestimmt.

2.2. Messung des Infektionsverlaufes

Gruppen von Tieren wurden mit der gewünschten Anzahl von Listerien in der log-Phase in 0,2 ml intravenös infiziert. 15 Minuten später und daraufhin alle 24 Stunden wurden fünf Tiere durch zervikale Dislokation getötet, Leber und Milz steril entnommen und in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung separat homogenisiert. Geeignete Verdünnungen des Homogenates wurden in 0,1 ml-Mengen auf Tryptose-Soya-Agar aufgetragen und die Zahl der gewachsenen Listerien-Kolonien nach 24 Stunden Inkubationszeit bestimmt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ließ sich die Keimzahl pro Leber und Milz errechnen. Durch Auftragen des Logarithmus der Bakterienzahlen gegen die Zeit ergibt sich eine Verlaufskurve der Infektion.

2.3. Aktive Immunisierung

Prospektive Milzzellspender erhielten 5×10^3 - 1×10^4 lebende Listerien intravenös. Die Immunisierung der DTL-Spender erfolgte durch subkutane Injektion von 8×10^3 - 2×10^5 lebenden Listerien in Nackenhaut, Schwanzwurzel und Fußballen. Mäuse, deren Lymphe auf MIF-artige Aktivität untersucht wurde, erhielten vier Stunden vor Beginn der Operation eine zusätzliche Injektion von ca. 5×10^4 Listerien.

2.4. Nachweis der allergischen Reaktion vom verzögerten Typ

2.4.1. Herstellung des Listerienantigens

Zehnfach konzentrierte Trypticase-Soya-Bouillon wurde gegen Aqua dest. dialysiert. In dem Dialysat wurde eine

Listerienkultur angesetzt und für 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Aus der gewonnenen Bakteriensuspension wurde ein steriles Kulturfiltrat hergestellt und dieses in einer Desaga-Anlage eingeeengt.

2.4.2. Messung der allergischen Reaktion vom verzögerten Typ

Sechs Tage nach der intravenösen Infektion mit lebenden Listerien wurden 0,05 ml des Antigens in den linken hinteren Fußballen von je fünf immunisierten Tieren injiziert und in den rechten hinteren Fußballen zur Kontrolle das selbe Volumen physiologischer Kochsalzlösung. Mit nicht-immunisierten Kontrolltieren wurde in derselben Weise verfahren. Nach 24 Stunden wurde die Dicke der Fußballen auf beiden Seiten mit Hilfe eines Schnelltasters gemessen und der Mittelwert der Differenzen errechnet.

2.5. Passive Immunisierung

2.5.1. Passive Immunisierung durch Übertragung von Milzsuspension aus immunisierten Spendern

Sechs Tage nach einer immunisierenden Infektion wurden die Milzen steril entnommen, in kaltem MEM zerteilt und in einem Homogenisatorgefäß mit eingeschliffenen Glaskolben homogenisiert. Die Zellsuspension wurde anschließend durch vier Lagen sterilen Verbandmulls gefiltert, zweimal bei 1200 Upm 15 Minuten lang zentrifugiert, gezählt und auf die gewünschte Zellkonzentration verdünnt. Die Anzahl der lebenden Zellen wurde mit der Trypanblau-Ausschlußmethode bestimmt. Pro Maus wurden $1 - 2 \times 10^8$ vitale Zellen intravenös appliziert. Die Zellempfänger und unbehandelten Kontrollen erhielten sofort anschließend $5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ lebende Listerien intravenös. Der Unterschied in der Zahl der Keime in Leber und Milz von

passiv geschützten und normalen Kontrolltieren ist ein Maß für die erzielte Protektion gegenüber Listerien durch passive Immunisierung.

2.5.2. Passive Immunisierung durch Ductus thoracicus-Lymphozyten (DTL)

Die im folgenden beschriebene Technik wurde in ihren wesentlichen Zügen von Sprent (38) und Boak (3) übernommen.

2.5.2.1. Gewinnung von Zellen und Lymphe

a) Operationsvorbereitung:

Um den Ductus thoracicus unter der Operation besser sichtbar zu machen, wurde den Tieren eine Stunde vor der Operation nach einer zwölfstündigen Durstperiode peroral Büchsenmilch als Fettquelle zugeführt. Dieser Zeitpunkt ist kritisch, da bei zu früher Gabe der Milch der Wundverschluß durch das überblähte Intestinum erschwert wird.

b) Anästhesie:

Zur Anästhesie wurden zwischen 0,5 und 0,8 ml des Gemisches in zwei Teilmengen intraperitoneal injiziert. Vor Beginn des Eingriffes wurde eine Infusion in eine der lateralen Schwanzvenen gelegt.

c) Operationsvorgang:

Die anästhesierte Maus befand sich in rechter Seitenlage. Nach Befeuchten des Fells mit 70 %igem Alkohol wurde dieses unter Mitnahme eines Fellstreifens vom Ansatz der Vorder- bis zum Ansatz der Hinterpfoten breit eröffnet und das Peritoneum durch zwei Scherenschläge quer zur Körperachse gespalten. Der Schnitt reichte von der Rückenmuskulatur bis zum unteren Schnitttrand des Fells. Es wur-

den nun vier Retraktoren eingesetzt und auf dem Operationsbrett so befestigt, daß ein quadratisches Operationsfeld entstand. Durch ein kleines Loch im Peritoneum bzw. der Muskulatur des hinteren Wundwinkels wurde nun die Drainagekanüle durchgeführt und erhielt hier ihren ersten Fixpunkt. Um ein gezieltes Manipulieren zu gewährleisten, war es zweckmäßig, die Beweglichkeit des Katheters weiter einzuschränken und mit zwei Nadeln auf der Unterlage zu befestigen. Das distale Ende der Kanüle soll V-förmig zugeschnitten werden, um hierdurch ein Anlegen der Kanülenöffnung an die Wand des Ductus thoracicus zu vermeiden.

Die eigentliche Präparation des Ductus thoracicus erfolgte unter dem Operationsmikroskop. Die linke Niere wurde mit zwei Wattestäbchen unter drehenden Bewegungen aus ihrem Lager gelöst und nach ventral luxiert. Kranial der linken Nierenvene wurde nach Abstreifen von Bindegewebe der Ductus sichtbar. Er wurde mit einer sehr feinen Uhrmacherpinzette durch leichtes Eindrücken mit der geschlossenen Spitze und anschließendes vorsichtiges Spreizenlassen eröffnet. Man konnte sich am Austreten von Lymphe davon überzeugen, daß der Ductus thoracicus eröffnet war. Bevor die mit Heparin durchspülte Kanüle eingelegt wurde, mußte sie mit Kochsalzlösung aufgefüllt werden, damit nach dem Einlegen ein genügend starker Sog entstand, um die Lymphe anzusaugen. Nach dem Einbringen der Kanülenspitze in die Perforation des Ductus mußte man sich von der richtigen Position überzeugen, indem man die Kanülenspitze anhob; hierbei mußte die bereits eingetretene Lymphe in den Ductus thoracicus zurücklaufen. Anschließend wurde die Kanüle mit Bucrylat^R fixiert. Hierzu wurde ein sehr kleiner Tropfen des Gewebeklebers auf die Perforation aufgebracht. Nur bei Verwendung kleinster Mengen wurde ein rasches Antrocknen gewährleistet und die Klebstoffaspiration in die Kanüle verhindert. Eine weitere Vorsichtsmaßnahme zur Vermeidung dieser Komplikation war das Anheben der Kanüle während der Klebstoffapplikation; durch die zurückströmende Lymphe wurde dann die Aspiration

von Klebstoff verhindert. Der Katheter konnte noch zusätzlich entlang der Rückenmuskulatur durch kleine Bucrylatmengen befestigt werden.

Nach Einbringen einiger Tropfen Kochsalzlösung in die Bauchhöhle wurde diese durch drei Michel-Klemmen verschlossen. Das eröffnete Peritoneum bedurfte keiner besonderen Versorgung. Die Hautwunde wurde dann zusätzlich mit Kollodium bestrichen. Bei dieser Wundversorgung war darauf zu achten, daß die Kollodiumschicht nicht bis an die letzte Klammer heranreichte. Bei einer Fixierung der Kanüle an ihrer Austrittsstelle durch Kollodium könnte sie nämlich später bei Bewegungen der Maus leicht dort herausgezogen werden.

Die Befestigung der Maus auf dem Spezialgestell erfolgte durch selbstklebendes Tesa-Band.

Die intravenöse Infusion bot zwei Vorteile:

- 1) Kurz vor der Eröffnung des Ductus thoracicus konnte durch Infusion von 0,6 - 0,8 ml physiologischer Kochsalzlösung der zentrale Venendruck passager stark erhöht werden. Dadurch kam es zu verstärktem Lymphfluß, der das Einlegen der Kanüle erleichterte und die Anfangsausbeute an Lymphe erhöhte.
- 2) Durch Dauerinfusion mit Infusionssystemen für die gesamte Drainagedauer (1 ml/Std. Ringer-Glukose-Lösung pro Maus) konnte die Bildung von Clots verhindert werden. Es war jedoch im allgemeinen einfach, diese mit entsprechend langen Pferdehaaren zu entfernen.

2.5.2.2. Verarbeitung der Zellen

a) Morphologie:

Ausstriche von abzentrifugierten Lymphozyten wurden nach

May-Grünwald gefärbt. Bei der Differenzierung wurden als kleine Lymphozyten solche Zellen betrachtet, die einen chromatindichten Kern und einen dünnen Zytoplasmasaum aufwiesen. Sie entsprechen in ihrer Größe den Erythrozyten. Als große Lymphozyten wurden solche Zellen bezeichnet, die einen großen, aufgelockerten Zellkern und reichlich Zytoplasma zeigten. Auf die Differenzierung von mittelgroßen Lymphozyten wurde verzichtet (Ölimmersion, 400fach).

b) Zelltransfer und Messung der übertragenen Immunität:

Die Lymphe wurde in einem Glaskolben mit je 1 ml MEM (+ Zusätze s. o.) über eine Periode von 24 Stunden gesammelt und die Zellen anschließend abzentrifugiert (1200 Upm, 15 Minuten). Nach zweimaligem Waschen, Zählen und Resuspendieren wurde eine Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau-Ausschlußmethode durchgeführt. Die Zellen wurden dann in 0,5 ml aufgenommen und in normale Empfängertiere injiziert. Kontrollen erhielten entweder dieselbe Zahl von Zellen aus nichtimmunisierten Tieren oder keine Zellen. Alle Gruppen wurden anschließend mit einer Infektionsdosis von 5×10^4 - 1×10^5 lebenden Listerien/Maus infiziert und die Zahl der Bakterien in Leber und Milz nach 48 Stunden bestimmt. Die Differenz in der Zahl der Keime in Leber und Milz von passiv geschützten und normalen Kontrolltieren ist ein Maß für den erzielten antibakteriellen Schutz.

2.5.2.3. Verarbeitung der Lymphe

a) Lymphe:

Aus der zu untersuchenden Lymphe wurden die zellulären Bestandteile entfernt (3 x 10 Minuten, 1200 Upm) und die Lymphe im MIF-Test auf Makrophagen-inhibierende Eigenschaften untersucht.

b) Makrophagen-Gewinnung:

Das Peritoneum der Spendermäuse wurde mit 3,0 ml kaltem MEM ausgewaschen, die Makrophagen gepoolt, dreimal gewaschen (800 Upm, 10 Minuten) und auf die gewünschte Dichte eingestellt.

c) MIF-Test:

Lympe wurde in verschiedenen Konzentrationen verdünnt mit MEM verwendet. Kapillarröhrchen (1,2 mm Ø) wurden mit der Makrophagensuspension gefüllt, am unteren Ende verschlossen und zentrifugiert (600 Upm, fünf Minuten). Die Röhrchen wurden dann etwa 0,5 mm unterhalb der Zellgrenzfläche abgeschnitten und mit Silikonfett in der Kammer befestigt. Die Lympe wurde in die Kammer eingefüllt und diese mit einem Deckplättchen verschlossen. Nach 20 Stunden Inkubationszeit bei 37° C wurde der Migrationsradius der Makrophagen gemessen. Es wurde dazu ein Mikroskop mit Okularmikrometer verwendet. Die Hemmung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$100 - \frac{100 \times \text{durchschnittliche Migration inf. Tiere}}{\text{durchschnittliche Migration der Kontrollen}}$$

C) Ergebnisse

I. Erarbeitung des Versuchsmodells

1. Messung des Verlaufs einer experimentellen Listeriose

In einem typischen Experiment werden Mäuse mit $2 - 5 \times 10^3$ Listerien in der logarithmischen Wachstumsphase intravenös infiziert und, wie in Materialien und Methoden angegeben, eine Keimzahlbestimmung in Leber und Milz vorgenommen. Nach Auftragen der Logarithmischen Werte der Bakterienzahlen gegen die Zeit ergibt eine Vermehrungskurve, die den Infektionsverlauf widerspiegelt (Abb. I).

Lebende Listerien

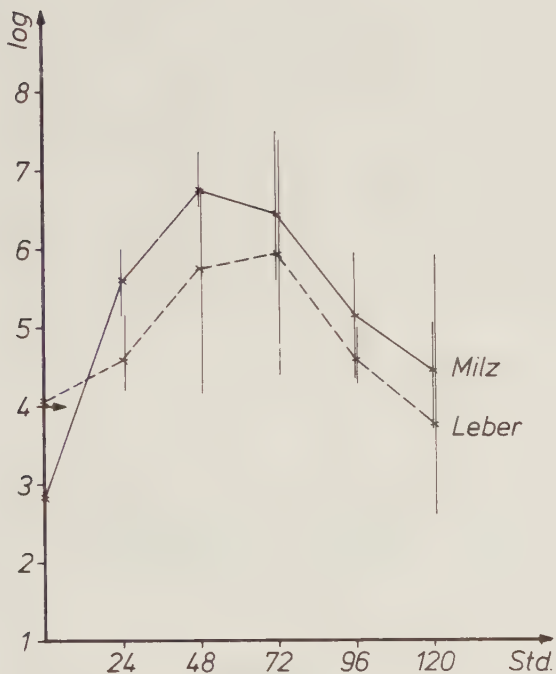


Abb.I: Verlauf einer Listerieninfektion in Leber und Milz intravenös infizierter Mäuse. Jeder Punkt repräsentiert den Durchschnittswert für fünf Tiere mit Gesamtstreuung.

Fünfzehn Minuten nach der Injektion ist das Blut bereits bakterienfrei, wie sich an Blutproben aus dem Retro-orbitalplexus zeigen läßt. Der Großteil der Keime ist zu diesem Zeitpunkt in Leber und Milz nachweisbar. Dabei enthält die Leber regelmäßig etwa 90 % der injizierten Bakterien und die Milz nur 10 %. Dieses Bild ändert sich im Verlauf der folgenden 24 Stunden. In der Milz erfolgt in diesem Zeitraum eine Vermehrung um das Hundertfache, in der Leber aber nur um das Zehnfache. In der folgenden Periode bewegen sich die Keimzahlverschiebungen innerhalb derselben Größenordnung und in etwa parallel. Zwischen dem zweiten und dritten Infektionstag kommt die Nettovermehrung der Listerien zum Stillstand, die Kurve flacht ab und sinkt in den folgenden Tagen.

2. Testung des Immunstatus mit Hilfe der allergischen Reaktion vom verzögerten Typ

Wie von anderen Autoren angegeben (19), besteht am fünften und sechsten Tag einer Listerieninfektion bei der Maus eine optimale Bereitschaft zur Ausbildung einer allergischen Reaktion vom verzögerten Typ gegen Listerienantigene. In unseren eigenen Experimenten benutzten wir die allergische Spätreaktion als Indikator dafür, daß prospektive Zellspender ordnungsgemäß sensibilisiert waren. In Abb. II ist der Ausfall einer allergischen Reaktion vom verzögerten Typ gegen Listerienantigene, gemessen an der Dickenzunahme der Fußballen bei Mäusen mit einer sechs Tage alten Listerieninfektion, wiedergegeben. Die infizierten Tiere zeigen eine deutlich meßbare Dickenzunahme des Antigen-injizierten Fußballens. Eine Dickenzunahme von mehr als 0,3 mm gilt als spezifisch.

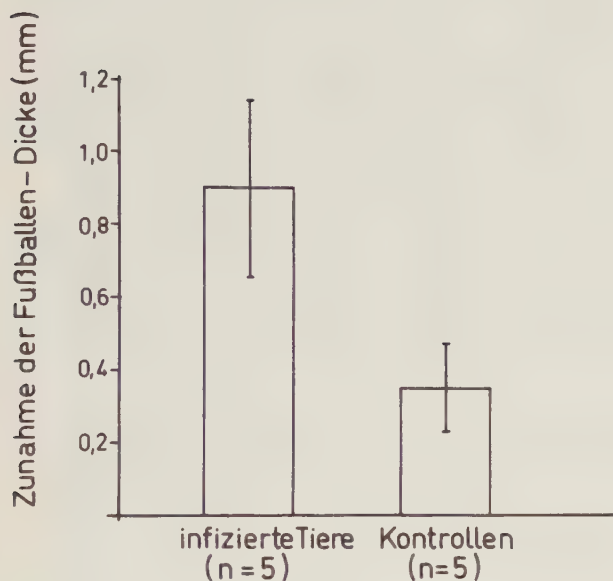


Abb. II: Allergische Reaktion vom verzögerten Typ gegen Listerienantigen bei infizierten (d. h. immunisierten) Tieren und nicht-vorbehandelten Kontrollen. Durchschnittswerte von je fünf Tieren. Es ist die Gesamtstreuung angegeben.

3. Übertragung von Antilisterien-Immunität durch Milzzellen aus Spendern mit einer sechs Tage alten Listerieninfektion

Der optimale Zeitpunkt für die Gewinnung von Milz-Lymphozyten für den Transferversuch fällt mit dem Maximum der allergischen Reaktion vom verzögerten Typ zusammen (19). Fünf Tage nach einer immunisierenden Infektion prospektiver Zellspender mit 1×10^4 lebenden Listerien wurde die allergische Reaktion vom Spättyp wie geschildert induziert und nach positivem Ausfall am sechsten Tage eine Milzzellsuspension (wie in Materialien und Methoden beschrieben) aus den Milzen der immunisierten Tiere hergestellt. Nach Übertragung von 2×10^8 Milzzellen auf normale Empfänger wurden diese, sowie nicht-vorbehandelte Kontrolltiere, infiziert und die Zahl der Bakterien in Leber und Milz nach 24 und 48 Stunden bestimmt.

Nach 48 Stunden hat sich ein deutlicher Unterschied in den Keimzahlen in Leber und Milz der passiv geschützten und der Kontrolltiere ergeben, der in diesem Experiment etwa vier Zehnerpotenzen beträgt.

Auf die zusätzliche Kontrolle der Übertragung einer gleichen Anzahl von Milzzellen aus normalen, nicht-immunisierten Spendern wurde verzichtet, da aus der Literatur hinreichend bekannt ist (18), daß Milzzellen aus Normaltieren den Infektionsverlauf in den Empfängern während der ersten 48 Stunden der Infektion nicht beeinflussen.

Abb. III gibt das Ergebnis eines typischen Übertragungsexperiments wieder.

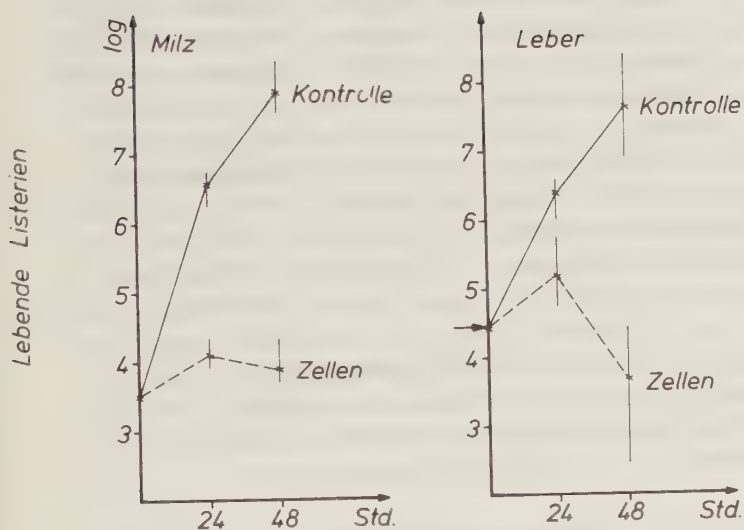


Abb. III: Passive Zellular-Immunisierung mit 2×10^8 Milzzellen. Jeder Punkt gibt den Mittelwert der Bakterienzahlen in je fünf Tieren mit Gesamtstreuung wieder. Kontrollen erhielten keine Zellen.

II. Untersuchungen mit der Lymphe aus Listeria-immunen Mäusen

1. Zelluläre Zusammensetzung

Am sechsten Tag nach einer subkutanen, immunisierenden Infektion mit lebenden Listerien wurde an einer Gruppe von fünf Mäusen eine Prüfung auf das Vorliegen einer allergischen Reaktion vom verzögerten Typ gegen Listerien-Antigene durchgeführt. Bei dem Rest der Mäuse wurde eine Ductus-thoracicus-Fistel angelegt und die Lymphozyten wie in Materialien und Methoden angegeben gesammelt, Ausstriche angefertigt und nach May-Grünwald gefärbt. In einem typischen Experiment ergab sich bei den Normalen, nicht immunisierten Kontrollen ein Verhältnis von 86 % kleinen Lymphozyten zu 14 % großen Lymphozyten. In der Lymphe immunisierter Tiere fanden sich dagegen 93 % kleine und 7 % große Lymphozyten. Andere Zelltypen ließen sich morphologisch nicht nachweisen. Die Zahl der gewonnenen Lymphozyten schwankte von Tier zu Tier und betrug im Durchschnitt bei einer Drainagedauer von 24 Stunden $1 - 2 \times 10^7$ Zellen pro Maus.

2. Die biologische Aktivität von Ductus-thoracicus-Lymphozyten aus Listeria-immunen Mäusen

Für ein Übertragungsexperiment wurden mindestens 5×10^7 Lymphozyten durch Ductus-Drainage gewonnen. Die Zellen wurden abzentrifugiert, gewaschen und der Prozentsatz der lebenden Zellen mit der Trypanblau-Ausschlußmethode bestimmt. Er lag regelmäßig über 90 %. Anschließend wurden 5×10^7 Lymphozyten pro Tier auf normale Empfänger übertragen und anschließend eine Infektion $5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ lebenden Listerien vorgenommen. Pro Zellempfänger wurden fünf unbehandelte Kontrolltiere infiziert. Die Keimzahlbestimmung erfolgte 48 Stunden nach der Infektion, Tab. II faßt die Ergebnisse der Übertragungsexperimente zusammen.

Logarithmen der Keimzahl pro Organ bei vorbehandelten
und unbehandelten Mäusen

Versuch r.	Milz			Leber		
	vorbe- handelt mit DTL	unbe- handelt Kontrolle	Diffe- renz der Logarithm.	vorbe- handelt mit DTL	unbe- handelt Kontrolle	Diffe- renz der Logarithm. Δ
1	7.0000	7.9526	0.9526	6.7709	7.8043	1.0334
2	6.7634	7.9526	1.1892	5.6990	7.8043	2.1053
3	7.5563	7.9526	0.3963	6.5315	7.8043	1.2728
4	4.1139	7.9526	3.8387	3.9542	7.8043	3.8501
5	7.5441	7.9526	0.4085	6.6990	7.8043	1.2053
6	6.0531	7.1657	1.1126	4.6990	5.9571	1.2481
7	5.5911	8.1481	2.5570	6.0992	9.0827	3.0035
8	6.2304	7.5235	1.2931	5.3222	6.5490	1.2268
9	6.6721	7.6748	0.9828	5.7482	8.0267	2.2785
0	7.5441	8.1283	0.5842	6.0000	8.6147	2.6147
1	7.3010	8.5137	1.2127	6.6990	8.6297	1.9307

Tab. II: Passive Zellular-Immunisierung mit Ductus-
thoracicus-Lymphozyten aus Listeria-
Spendermäusen. Pro Empfänger wurden 5×10^7
Lymphozyten injiziert.

DTL = Ductus-thoracicus-Lymphozyten aus immunisierten
Tieren

Δ = Differenz der Logarithmen der Keimzahlen in
Zellempfängern und Kontrolltieren

Aus den Daten der Tab. II geht hervor, daß in jedem Versuch durch die Übertragung von Ductus-thoracicus-Lymphozyten aus immunisierten Tieren antibakterieller Schutz übertragen wurde. Die Keimzahl der mit DTL vorbehandelten Tiere war signifikant niedriger als bei den Kontrollen ($p < 0.01$) Wilcoxon Test), welche keine Zellen aus immunen Spendertieren erhalten hatten. Kontrollexperimente, bei denen Ductus-thoracicus-Lymphozyten aus normalen, nicht-immunisierten Spendern übertragen wurden, wurden aus technischen Gründen an anderen Tagen als die Übertragungsexperimente mit Zellen aus immunisierten Tieren durchgeführt. Bei diesen Kontrollexperimenten wurden ebenfalls 5×10^7 Ductus-thoracicus-Lymphozyten normaler Tiere pro Empfänger übertragen und anschließend die Empfänger sowie unbehandelte Kontrollen infiziert.

Da Milzlymphozyten aus normalen Tieren bekanntlich (18) keinen Einfluß auf den Infektionsverlauf ausüben, war anzunehmen, daß auch Ductus-thoracicus-Lymphozyten aus normalen Tieren den Infektionsverlauf in den Empfängern nicht beeinflussen würden. Dies war der Grund dafür, daß nur fünf Kontrollexperimente mit Lymphozyten aus nicht-immunisierten Spendern durchgeführt wurden. Tab. III gibt eine Übersicht über diese Kontrollexperimente.

Unterschied der Keimzahl pro Zelle bei verschiedenen
und verschiedenen Haploiden

Keimzahl mit DNL	Keimzahl Kontrolle	Logarithm. mit DNL	Keimzahl Kontrolle	Logarithm. mit DNL	Differenz Logarithm.
1.2777	1.2777	-0.5225	1.2777	-0.5225	-0.0000
5.4777	5.4777	-0.5225	5.4777	-0.5225	-0.0000
1.2777	1.2777	-0.5225	5.2777	-0.2777	+0.0330
1.2777	5.2777	-0.5225	1.2777	-0.5225	-1.7173
5.2777	1.2777	-0.5225	5.2777	-0.2777	-0.7078

Abb. 111 Unterschied der Keimzahl pro Zelle bei verschiedenen
von DNL- und DNL-Keimzellen aus nicht-
inaktivierten Haploiden und normalen Kontrollen.

Abb. 112 Unterschied der Keimzahl pro Zelle bei verschiedenen

L = Differenz der Logarithmen der Keimzahlen in
Zellreihen und Kontrollreihen

Die zentrale Lymphe Listerien-immunisierter Mäuse enthält demnach immunologisch aktive Lymphozyten, die in der Lage sind, die antibakterielle Abwehrleistung zu induzieren. Dieses Ergebnis legte es nahe, bei immunisierten Tieren in der zentralen Lymphe auch nach Mediatoren zu suchen, die als Vermittler der Wechselwirkung zwischen Lymphozyten und Makrophagen in Frage kommen könnten. Es wurde der MIF-Test wegen der einfachen Durchführung und leichten Reproduzierbarkeit gewählt.

3. Nachweis von MIF-artiger Aktivität in der zentralen Lymphe Listeria-immuner Mäuse

Für den Nachweis von MIF-artiger Aktivität in der zentralen Lymphe wurden Tiere verwendet, die fünf Tage vor der Operation durch eine Injektion mit 5×10^4 lebenden Listerien immunisiert worden waren. Die verwendeten Tiere wurden vier Stunden vor Operationsbeginn mit 5×10^4 Listerien geboostert.

Lymphe wurde in der beschriebenen Weise gewonnen und nach Abzentrifugieren der Zellen der zellfreie Überstand im mit Kulturmedium gemischt und im herkömmlichen MIF-Test auf inhibierende Wirkung auf Peritoneal-Makrophagen untersucht.

Die Ergebnisse sind in Tab. IV wiedergegeben. Es zeigt sich, daß die Lymphe aus immunisierten und geboosterten Mäusen einen hemmenden Effekt auf die Migration von Peritoneal-Makrophagen aus nicht-vorbehandelten Spendern haben. Der Effekt erwies sich als statistisch signifikant gegenüber Kontrollen aus nicht-immunisierten Lymph-Spendern.

Experiment Nr.	Lymph- konz.	Durchschnittliche Migrationshemmung ¹	Prozent Hemmung	p ²
		Kontrolle	immunisiert + geboostert	
1	35 %	2,36 $\pm$ 0,37 (n=6)	2,00 $\pm$ 0,14 (n=6)	0,05
2	50 %	1,63 $\pm$ 0,13 (n=8)	1,32 $\pm$ 0,21 (n=8)	0,05
3	60 %	1,25 $\pm$ 0,14 (n=8)	0,61 $\pm$ 0,29 (n=8)	0,001
4	70 %	1,95 $\pm$ 0,20 (n=8)	0,82 $\pm$ 0,44 (n=6)	0,001

¹ = Durchschnittswerte $\pm$ Standardabweichung (für zufälligen Eindeuten)

t-Test für unverbundene Stichproben

Tab. VI: ATP-artige Aktivität in der zentralen Lymphe von Listeria-impfungen und geboosterten Mäusen

D) Diskussion

Erst in den vergangenen zehn Jahren hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, daß den zellulären Produkten des Immunsystems bei der Erhaltung der körpereigenen Individualität eine Bedeutung zukommt, welche derjenigen der humoralen Antikörper nicht nachsteht. Die Ergebnisse der zellulären Immunologie haben bewiesen, daß T-Lymphozyten bei der Abwehr von intrazellulären bakteriellen Infektionen (16), Viren (1), Parasiten (7, 36) sowie von Tumoren (33, 34, 35) eine entscheidende Rolle spielen. In paradigmatischer Weise konnte die Rolle der spezifisch reagiblen T-Lymphozyten in der antibakteriellen Infektabwehr am Modell der Listeriose der Maus aufgeklärt werden. Hier waren es vor allem Arbeiten der Gruppe um Mackaness, die klar gezeigt haben, daß:

- a) Milzzellsuspensionen aus entsprechend immunisierten Tieren eine antibakterielle Immunität passiv übertragen,
- b) die entscheidenden Zellen lebende Lymphozyten sind (18), und
- c) dieses System gegenüber anti-theta-Serum empfindlich ist (15, 28) und somit die spezifischen Elemente aus den Thymus-abhängigen T-Lymphozyten bestehen.

Die weitere Erforschung dieser Zellart hängt offensichtlich davon ab, daß es zunächst gelingen muß, möglichst reine Populationen von spezifischen T-Lymphozyten zu gewinnen. Diese Erwägung veranlaßte uns, Milzzellsuspensionen als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von spezifisch reagiblen Lymphozyten fallenzulassen und durch Ductus-thoracicus-Drainage zu versuchen, das angegebene Ziel zu erreichen. An der Ratte waren bereits entsprechende Versuche durch McGregor erfolgreich durchgeführt worden (23). Die Ratte eignet sich zwar wegen ihrer Größe zur Ductus-thoracicus-Drainage besser als die Maus, Versuche an der Ratte haben aber den Nachteil, daß die Ratte nicht in dem Ausmaß als immunologisches Modell benutzt wird wie die Maus. Die an der Ratte gewonnenen Ergebnisse können daher nicht uneingeschränkt in immunologische

Konzepte, wie sie an der Maus entwickelt worden sind, eingebaut werden. Die Tatsache, daß die Ductus-Drainage der Maus technisch wesentlich schwieriger als bei der Ratte ist, scheint der Grund dafür zu sein, daß in der Literatur noch kein Bericht über das Vorkommen von spezifisch reagiblen Lymphozyten in der zentralen Lymphe von Listeria-immunen Mäusen veröffentlicht worden ist. In unseren Versuchen sollte diese Lücke geschlossen werden und nach Gewinnung von reinen Lymphozytensuspensionen aus immunisierten Tieren versucht werden, ihre biologische Funktion im etablierten Transfer-Test-Modell zu prüfen.

Es gelang aus dem Ductus thoracicus von Mäusen mit einer sechs Tage alten Listerieninfektion Lymphozyten zu gewinnen, die sich im Transfer-Experiment als funktionsfähige Überträger von antibakterieller Immunität erwiesen. Eine Zahl von 5×10^7 lebenden Ductus-thoracicus-Lymphozyten reichte aus, um in normalen, nicht-immunisierten Empfängertieren einen signifikanten antibakteriellen Schutz zu erzeugen. Die übertragene Schutzwirkung manifestierte sich sowohl in der Leber als auch in der Milz der Zellempfänger. Auffällig war jedoch, daß sich in fast allen Experimenten der Schutz stärker in der Leber als in der Milz manifestierte. Dieses Verteilungsmuster steht im Gegensatz zu den Befunden, welche mit übertragenen Milzzellen erhoben wurden; hier ist es im allgemeinen die Milz, die den stärkeren antibakteriellen Schutz zeigt. Die Ursache für das unterschiedliche Verhalten der verschiedenen Lymphozytenpopulationen dürfte in einer unterschiedlichen "homing"-Eigenschaft der benutzten Zellen liegen. Ob hierbei die Tatsache eine Rolle spielt, daß keine streng syngeneten Mäuse verwendet wurden, sei dahingestellt: Es besteht die Möglichkeit, daß die homologen Lymphozyten in der Leber in stärkerem Ausmaß abgefangen werden, als dies bei Verwendung autologer Zellen der Fall wäre. Diese Fragen müssen in weiteren Versuchen an syngeneten Tieren geklärt werden.

Die Drainage hat sich auch in unseren Händen technisch als nicht einfach erwiesen, und daher konnte nur eine relativ geringe Menge an Zellen pro Experiment gewonnen werden. Es war daher nicht möglich, im Rahmen dieser Arbeit quantitative Untersuchungen (Dosis-Wirkungskurve) durchzuführen. Auch bei einwandfrei kanülierten und drainierenden Tieren wurden nur etwa $1/5$ der in der Literatur (38) angegebenen Zellzahlen gewonnen. In persönlichen Gesprächen mit den Autoren der Vergleichsarbeiten stellte sich heraus, daß ein Großteil der in Europa verwendeten Mäuse offenbar nicht frei von Virusinfektionen ist. Dadurch wäre der reduzierte Lymphozytenfluß erklärt.

Die geschilderten Versuche haben trotz der angeführten Mängel eindeutig ergeben, daß bei den *Listeria*-infizierten Mäusen ausreichende Mengen von Lymphozyten mit protektiver Potenz im Ductus thoracicus auftreten. Hiermit ist bewiesen, daß die zentrale Lymphe als geeignetes Ausgangsmaterial für die in der Einleitung weiteren Untersuchungen in Frage kommt.

Die erfolgreiche Durchführung der Drainage des Ductus thoracicus ermöglichte es weiterhin, die anfallende Lymphe auf ihren Gehalt an möglichen Mediatorstoffen der Lymphozyten-Makrophagen-Interaktion zu untersuchen. Die Notwendigkeit zu einem solchen Experiment ergab sich für uns aus der Tatsache, daß bei in vitro-Versuchen eine große Zahl von Mediatoren gefunden wurde (31), die, die von Antigen-stimulierten T-Lymphozyten produziert, auf Makrophagen einwirken. Trotz der zahlreichen in vitro-Untersuchungen über die Natur und Wirkungsweise dieser sogenannten Lymphokine ist ihre biologische Bedeutung am Ganztier noch weitgehend ungeklärt.

Ein Nachweis Lymphokin-artiger Stoffe im immunisierten und infizierten Ganztier würde einen direkten Hinweis auf die biologische Relevanz von Lymphokinen darstellen. So haben einige Autoren (13, 37) Befunde in dieser Richtung erhoben.

Diese Arbeiten wurden aber unter der Fragestellung der verzögerten Allergie durchgeführt. Entsprechendes für die Mechanismen der Zell-Zell-Kolloration in der zellulären antibakteriellen Immunität scheint jedoch noch nicht publiziert zu sein.

Der in dieser Studie durchgeführte Nachweis von MIF-artiger Aktivität in der zentralen Lymphe immunisierter und geboosterter Mäuse ist der erste Hinweis darauf, daß Lymphokine am Ganztier als "messenger"-Substanz für die Übermittlung von Informationen zwischen spezifisch reagiblen Lymphozyten und Makrophagen verantwortlich sein könnten.

Eine weitere Charakterisierung der MIF-artigen Aktivität wurde in diesem Experiment nicht versucht, da für den formalen Nachweis der Identität von in vitro gebildeten und in vivo gefundenen Substanzen noch keine Voraussetzungen bestehen. Hierfür wäre es notwendig, daß Lymphokine in gereinigter Form vorlägen, so daß man einen Antikörper produzieren könnte, um damit serologisch den Nachweis der Identität zu erbringen.

E) Zusammenfassung

- 1) Die Technik der Ductus-thoracicus-Drainage der Maus wurde aufgebaut und in technischen Details über in der Literatur Publiziertes ergänzt. Die Verwendung reiner Lymphozytensuspensionen erlaubte, die Lymphozytennatur der immunitätsübertragenden Zellen direkt zu beweisen. Außerdem stellen reine Lymphozytensuspensionen ein Substrat für weiterführende Studien über die Rolle und Eigenschaften der zellulären Immunprodukte im körpereigenen Abwehrsystem dar.
- 2) Die antibakterielle Schutzwirkung der Ductus thoracicus-Lymphozyten *Listeria*-immuner Tiere wurde mittels passiver Immunisierung von normalen Tieren und intravenöser Infektion mit *Listeria monocytogenes* bewiesen. Es ließ sich zeigen, daß 5×10^7 Lymphozyten aus dem Ductus thoracicus immunisierter Mäuse einen signifikanten Schutz übertragen. Zellen aus nicht-immunisierten Spendern sind nicht in der Lage, die Bakterienvermehrung in Leber und Milz zu hemmen. Ductus thoracicus-Lymphozyten scheinen andere "homing"-Eigenschaften zu haben als Milzlymphozyten: Sie manifestieren in der Leber einen größeren Schutz als in der Milz.
- 3) Durch Untersuchung der zentralen Lymphe auf MIF-artige Aktivität sollte die Möglichkeit der Relevanz von Lymphokinen am Ganztier bei der Abwehr von fakultativ intrazellulären Bakterien geprüft werden. Lymphe in verschiedenen Konzentrationen vermag die Makrophagenmigration im herkömmlichen MIF-Test signifikant zu hemmen.

F) Literaturverzeichnis

1. Blanden, R. V.: Mechanism of recovery from a generalized viral infection: Mousepox. I. The effects of anti-thymocyte serum. J. Exp. Med. 132 (1970), 1035 - 1054
2. Blanden, R. V.; G. B. Mackaness and F. M. Collins: Mechanisms of acquired resistance in mouse typhoid. J. Exp. Med. 124 (1966), 585 - 619
3. Boak, J. L. and M. F. A. Woodruff: A modified technique for collecting mouse thoracic duct lymph. Nature 205 (1965), 396 - 397
4. Chase, M. W.: The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 59 (1945), 134
5. Claman, H. N., E. A. Chaperon and R. F. Triplett: Thymus-marrow cell combinations. Synergism in antibody production. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122 (1966), 1167 - 1171
6. Coe, J. E., J. D. Feldman and S. Lee: Immunologic competence of thoracic duct cells. I. Delayed hypersensitivity. J. Exp. Med. 123 (1966), 267 - 281
7. Frenkel, J. K.: Adoptive immunity to intracellular infection. J. Immunol. 98 (1967), 1309 - 1319
8. Gaugas, M. J.: Enhancing effect of antilymphocytic globulin of human leprosy infection in thymectomized mice. Nature 220 (1968), 1246 - 1248
9. Glick, B., T. S. Chang and R. C. Jaap: The bursa of Fabricius and antibody formation. Poults-Sci. 35 (1956), 224

10. Godal, T., R. J. W. Rees and J. O. Lamvik: Lymphocyte-mediated modification of blood-derived macrophage function in vitro: Inhibition of intracellular mycobacteria with lymphokins. Clin. Exp. Immunol. 8 (1971), 625 - 637
11. Gowans, J. L. and J. W. Uhr: The carriage of immunological memory by small lymphocytes in the rat. J. Exp. Med. 124 (1966), 1017 - 1030
12. Hahn, H.: Zelluläre antibakterielle Immunität. Zbl. Bakt. Abt. I. Original 227 (1974), 184 - 195
13. Hay, J. B., P. J. Lachmann and Z. Trnka: The appearance of migration inhibiting factor and a mitigen in lymph draining tuberculin reactions. Eur. J. Immunol. 3 (1973), 127 - 131
14. Koster, F. and D. D. McGregor: Rat thoracic duct lymphocytes: Types that participate in inflammation. Science 167 (1970), 1137 - 1139
15. Lane, F. C. and E. R. Unanue: Requirement of thymus (T) lymphocytes for resistance to listeriosis. J. Exp. Med. 135 (1972), 1104 - 1112
16. Mackaness, G. B.: The immunology of antituberculous immunity. Amer. Rev. Resp. Dis. 97 (1968), 337 - 344
17. Mackaness, G. B.: The relationship of delayed hypersensitivity to aquired cellular resistance. Brit. Med. Bull. 23 (1967), 52 - 55
18. Mackaness, G. B.: The influence of immunological committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo. J. Exp. Med. 129 (1969), 973 - 992
19. Mackaness, G. B.: Cellular resistance to infection. J. Exp. Med. 116 (1962), 381 - 406

20. Mackaness, G. B.: The immunological basis of acquired cellular resistance. *J. Exp. Med.* 120 (1964), 105 - 120
21. Mael, J., Biroum-Noerjatin and R. Behin: Killing of intracellular parasites as a measure of macrophage activation. In: *Activation of Macrophages*, Ed.: W. - H. Wagner and H. Hahn, Vol. 2, *Excerpta Medica*, Amsterdam (1974), 260 - 266
22. McGregor, D. D. and J. L. Gowans: The antibody response of rats depleted of lymphocytes by chronic drainage from the thoracic duct. *J. Exp. Med.* 117 (1963), 303 - 320
23. McGregor, D. D., H. Hahn and G. B. Mackaness: The mediator of cellular immunity. V. Development of cellular resistance to infection in thymectomized irradiated rats. *Cell. Immunol.* 6 (1973), 186 - 199
24. Metschnikow, E.: *Immunity in infective diseases*. Cambridge University Press (1905)
25. Miller, J. F. A. P. and G. F. Mitchell: Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.* 128 (1968), 801 - 820
26. Miller, J. F. A. P. and J. Sprent: Thymus derived cells in mouse thoracic duct lymph. *Nature* 230 (1971), 267 - 270
27. Miller, J. F. A. P. and D. Osoba: Current concepts of the immunological function of the thymus. *Physiol. Rev.*, Baltimore 47 (1967), 437 - 520

28. North, R. J.: Importance of thymus-derived lymphocytes to cell-mediated immunity to infection. *Cell. Immunol.* 7 (1973), 166 - 176
29. Pantelouris, E. M. and P. A. Flisch: Responses of athymic ("nude") mice to sheep red blood cells. *Eur. J. Immunol.* 2 (1972), 236 - 239
30. Patterson, R. J. and G. P. Youmans: Notes: Demonstration in tissue culture of lymphocyte mediated immunity to tuberculosis. *Infect. and Immun.* 1/6 (1970), 600 - 608
31. Pick, E. and J. L. Turk: The biological activities of soluble lymphocyte products. *Clin. Exp. Immunol.* 10 (1972), 1 - 23
32. Rees, R. J.: Enhanced susceptibility of thymektomized and irradiated mice to infection with mycobacterium leprae. *Nature* 211 (1966), 657 - 658
33. Röllinghoff, M. and H. Wagner: In vitro induction of tumor specific immunity: Requirements for T-lymphocytes and tumor growth inhibition in vivo. *Eur. J. Immunol.* 3 (1973), 471 - 476
34. Rosenau, W. and D. L. Morton: Tumor-specific inhibition of growth of methylcholanthrene-induced sarcomas in vivo and in vitro by sensitized isologous lymphoid cells. *J. Nat. Cancer Inst., Wash.* 36 (1960), 825 - 834
35. Rouse, B. T., M. Röllinghoff and N. L. Warner: Tumor immunity to murine plasma cell tumors. II. Essential role of T-lymphocytes in immune response. *Eur. J. Immunol.* 3 (1973), 218 - 224

36. Ruskin, J., J. Macintosh and J. S. Remington: Studies on the mechanisms of resistance to phylogenetically diverse intracellular organisms. *J. Immunol.* 103 (1969), 252 - 259
37. Salvin, S. B., J. Nishio and M. Gribkik: Lymphoid cells in delayed hypersensitivity. I. In vitro vs. in vivo responses. *Cell. Imm.* 1 (1970), 62 - 77
38. Sprent, J.: Circulating T and B lymphocytes of the mouse. I. Migratory properties. *Cell. Imm.* 7 (1973), 10 - 39
39. Sprent, J. and A. Basten: Circulating T and B lymphocytes of the mouse. II. Lifespan. *Cell. Imm.* 7 (1973), 40 - 59
40. Wright, A. E. and S. R. Douglas: An experimental investigation of the role of the blood fluids in connection with phagocytosis. *Proc. Roy. Soc., London* 72 (1903), 357
41. Zinsser, H.: *Infection and Resistance*. In: 2nd ed. 1918, New York, Macmillan

Lebenslauf

Am 1. März 1950 wurde ich als Sohn des Richtmeisters Max Weber und seiner Frau Marianne, geb. Hutter in Friedberg/Bayern geboren.

In Gustavsburg/Hessen besuchte ich die Georg-August-Zinn-Schule von 1957 - 61 und wechselte dann auf das Staatliche Gymnasium am Kurfürstlichen Schloß in Mainz. Hier legte ich im Sommer 1969 die Reifeprüfung auf dem neusprachlichen Zweig ab.

Im Sommersemester 1970 begann ich das Studium der Medizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, nachdem ich dort vorher ein Semester Jura studiert hatte. Im Winter 1971 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im Sommer 1972 die ärztliche Vorprüfung ab. Zur Zeit bin ich im sechsten klinischen Semester und habe mich zum medizinischen Staatsexamen im Sommer 1975 angemeldet.

